NovaTec Immundiagnostica GmbH

Testosterone Saliva CE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Testosterone in human saliva

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative de la testostérone salivaire humaine

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 7
Français:	Page	8 à 13
Bibliography / Bibliographie	Page	14
Symbols Key / Explication des symboles	Page	15
Summary of Test Procedure/ Résumé de la procédure de test	Page	16

Product Number: DSNOV21 (96 Determinations)

1. INTRODUCTION

Testosterone (17β-Hydroxy-4-androstene-3-one) is a steroid hormone from the androgen group.
In post pubertal males, testosterone is secreted primarily by the testes with only a small amount derived from peripheral conversion of androstenedione. In adult women over 50% of serum testosterone is derived from peripheral conversion of androstenedione secreted by the adrenal and ovary, with the remainder from direct secretion of testosterone by these glands.
The level of testosterone in saliva (pg/ml) is significantly lower than levels in the general circulation (ng/ml).
Testosterone effects can be classified as virilizing and anabolic effects, although the distinction is somewhat artificial, as many of the effects can be considered both. Anabolic effects include growth of muscle mass and strength, increased bone density and strength, and stimulation of linear growth and bone maturation. Virilizing effects include maturation of the sex organs, and after birth (usually at puberty) a deepening of the voice, growth of the beard and axillary hair (male secondary sex characteristics).
Testosterone levels decline gradually with age in men (andropause). The signs and symptoms are non-specific, and are generally associated with aging such as loss of muscle mass and bone density, decreased physical endurance, decreased memory ability and loss of libido.
In females of all ages, elevated testosterone levels can be associated with a variety of virilizing conditions, including adrenal tumors and polycystic ovarian disease.

2. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Testosterone in saliva.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiter strip wells are precoated with anti-Testosterone antibodies (solid-phase). Testosterone in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled Testosterone (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is **inversely** proportional to the amount of Testosterone in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Anti-Testosterone IgG Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-Testosterone IgG; in re-sealable aluminium foil.
- **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Testosterone conjugate conc.:** 1 bottle containing 1 ml of horseradish peroxidase labelled Testosterone.
- **Incubation buffer:** 1 bottle containing 30 ml phosphate buffer pH 7.5, BSA 1 g/l, stabilizer.
- **TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 ml 3, 3´, 5, 5´-tetramethylbenzidine (H_2O_2-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact).
- **Wash solution 10x conc**.: 1 bottle containing 50 ml of a 10x concentrated solution of phosphate buffer 0.2 M, Proclin < 0.0015%
- **Testosterone Standards:** 5 bottles, 1 ml each

Standard 0:	0 pg/ml
Standard 1:	10 pg/ml
Standard 2:	50 pg/ml
Standard 3:	200 pg/ml
Standard 4:	1000 pg/ml

For SI UNITS: pg/ml x 3.47 = pmol/l

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foils
- 1 Test protocol
- 1 Distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Distilled water
- Glass tubes

- Plastic straw
- Centrifuge for 3000 rpm
- Rotating mixer

5. STABILITY AND STORAGE

The originally closed reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22…28°C) before starting the test run! At the end of the assay, store the reagents immediately at 2-8°C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-Testosterone IgG antibodies. Store at 2…8 °C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2…8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Dilution of Testosterone-HRP Conjugate

Prepare immediately before use. Add 10 µl of concentrated conjugate to 1000 µl of Incubation buffer. The volumes can be varied according to this proportion. Mix gently for 5 min on a rotating mixer. Stable for 3 hours at room temperature (22…28°C).

6.3. Testosterone Standards

Before use mix 5 min. with a rotating mixer. The standards are ready to use and have the following concentration of Testosterone:

Standard 0:	0 pg/ml
Standard 1:	10 pg/ml
Standard 2:	50 pg/ml
Standard 3:	200 pg/ml
Standard 4:	1000 pg/ml

Once opened the standards are stable for another 6 months at 2…8°C.

6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first use stable until expiry date.*

6.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first use stable until expiry date.*

6.6. Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.
In concentrated wash solution it is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 ml, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

7.1. Method and Limitations

The determination of Testosterone should be performed in saliva. It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw or “SALIVETTE” (Sarstedt, Ref. 511534500). Other equipment of sample collection commercially available has not been tested.

Collect saliva samples at the times indicated.
If no specific instructions have been given, saliva samples may be collected at any time, paying attention to the following indications:

a) If saliva collection has to be carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth.
b) During the day saliva should be collected at least 1 hour after any food or drink, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
c) It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other such extraneous materials.

7.2. Processing

Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube

1) Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
2) Store at – 20°C for at least 1 hour
3) Defrost samples
4) Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
5) The saliva sample is now ready to be tested.
6) Store the sample at 2…8°C for one week or at – 20°C for longer time.

7.3. Saliva Processing Instructions with Salivette Sarstedt

1) Remove the swab from the suspended insert of the Salivette
2) Gently chewing the swab for 1 minute produces a sufficient quantity of saliva.
3) Replace the swab into the Salivette and firmly close the tube using the stopper.
4) Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000 g (rcf) for saliva generation.
5) Remove the insert complete with the swab from the centrifuge vessel and discard. The clear saliva is now ready for analysis (at least 1 ml of saliva should be recovered with this method).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(eg. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(eg. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(eg. B2+C2)	for standard 4

It is necessary to determine standards and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.
A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100 µl standards and samples into their respective wells. Add 100 µl diluted conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour at 37°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

   Automatic washer: In case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.

   Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22…28°C) in the dark.**
7. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
   Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
8. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.
9.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample in the distribution and identification plan.

9. RESULTS

9.1. Calculation of Results

Calculate the mean of the absorbance (OD) for each point of the standard curve and of each sample.
Plot the mean value of absorbance of the standards (OD) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).
Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/ml.

9.2. Reference Value

As the values of salivary Testosterone have a cicardian pattern we suggest collecting the samples at the same hour (8 A.M.):
The following values can be used as preliminary guideline until each laboratory established its own normal range.

WOMAN:	normal	10 – 55 pg/ml
	Hirsutism	25 – 85 pg/ml
	(after treatment)	16 – 40 pg/ml
	PCO	20 – 50 pg/ml
CHILDREN:		35 – 160 pg/ml
MEN:		50 - 210 pg/ml
	Hypogonadism	10 – 80 pg/ml

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Testosterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

Intra Assay Variation
Within run variation was determined by replicate determination (16x) of two different saliva controls in one assay. The within assay variability is ≤ 8.0%.

Inter Assay Variation
Between run variations was determined by replicate measurements (12x) of three different saliva controls in different lots. The between assay variability is ≤ 13.2%.

11.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham:

Testosterone	100.0 %
DHT	16.0 %
Androstenedione	0.8 %
Androsterone	0.0 %
DHEA-S	0.0 %
Cortisol	0.0 %
Cortisone	0.0 %
17 α Estradiol	0.0 %
Estrone	0.0 %
Prednisone	0.0 %

11.3. Analytic Sensitivity

The lowest detectable concentration of Testosterone that can be distinguished from standard 0 is 2.96 pg/ml at the 95% confidence limit.

11.4. Accuracy

The recovery of 37.5 – 100 – 500 pg/ml of Testosterone added to two saliva sample gave an average value (±SD) of 98.97% ± 10.92% with reference to the original concentrations.

11.5 Correlation with RIA

The NovaTec Testosterone saliva ELISA kit was compared to another commercially available saliva assay. 32 saliva samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

y = 1,10 x - 0,98
r2 = 0,967
y = Testosterone saliva NovaTec Elisa kit
x = Testosterone saliva DRG Elisa kit

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Sample(s), which are contaminated microbiologically, should not be used in the assay. It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If it lasts longer then ten minutes, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Addition of the substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the addition of the substrate and the stopping solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during reaction. Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells. Failure to remove adhering solution adequately in the aspiration or decantation wash step(s) may result in poor replication and spurious results.

13. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use by professional persons. Not for internal or external use in humans or animals.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Addition of the TMB substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the TMB substrate and the stop solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^{R} as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled saliva.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H_2O_2 to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of Testosterone from 10 pg/ml to 1000 pg/ml.
- Treatment of the patient with cortisone, natural or synthetic steroids can impair Testosterone determination.
- Samples with concentrations higher than 1000 pg/ml should be diluted 1:2 with standard 0.

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
WARNING:	Some reagents contain small amounts of Proclin 300® as preservative. Avoid the contact with skin and mucous membranes!

13.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

14. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:	DSNOV21	Testosterone Saliva (96 Determinations)

FRANÇAIS

CE

1. INTRODUCTION

La testostérone (17β-Hydroxy-4-androstene-3-one) est une hormone stéroïdienne du groupe androgène.
Chez les hommes post pubertaires, la testostérone est principalement sécrétée par les testicules avec uniquement une petite quantité provenant de la conversion de l'androsténédione. Chez la femme adulte, plus de 50% de sérum de testostérone est dérivé de la conversion de l'androsténédione, sécrétée par les glandes surrénales et les ovaires, le reste provenant directement des sécrétions de testostérone par ces glandes.
Le niveau de testostérone salivaire (pg/ml) est significativement plus bas que les niveaux dans la circulation en général (ng/ml).
Les effets de la testostérone peuvent être classés comme des effets virilisants et anabolisants, bien que la distinction soit quelque peu artificielle, beaucoup de ces effets sont considérés comme virilisants et anabolisants. Les effets anabolisants conduisent à une augmentation de la force et de la masse musculaire, une augmentation de la force et densité osseuse et conduisent à la stimulation de la croissance et la maturation des os. Les effets virilisants impliquent la maturation des organes sexuels, et après la naissance (généralement à la puberté) à l'approfondissement de la voix, à la pousse de la barbe et des cheveux axillaires (caractéristiques sexuelles secondaires masculines).
Les niveaux de testostérone diminuent progressivement avec l'âge chez les hommes (andropause). Les signes et les symptômes ne sont pas spécifiques, et sont généralement associés avec l'âge comme la perte de muscle et de la densité osseuse, une endurance physique décroissante, la mémoire décroissante et une perte de la libido.
Chez les femmes de tout âge, les niveaux élevés de la testostérone peuvent être associés à une variété de conditions virilisantes, incluant les tumeurs de glandes surrénales et les maladies des ovaires polykistiques.

2. INDICATION D'UTILISATION

La méthode colorimétrique immunoenzymatique compétitive est utilisée pour la détermination quantitative de la testostérone salivaire.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Les puits de bandes de microdosage sont enduites d'anticorps anti-testostérone (phase solide). La testostérone dans l'échantillon rivalise avec la testostérone marquée à la peroxydase de raifort ajoutée (antigène marqué à l'enzyme) pour la liaison des anticorps. Après incubation, une séparation entre les produits liés et les anticorps libérés est effectuée par le rinçage de la phase solide. Le complexe immun formé par un antigène marqué à l'enzyme est observé par un ajout de substrat Tétraméthylbenzidine (TMB) qui conduit à un bleuissement du produit. L'intensité de ce produit est **inversement** proportionnelle à la quantité de testostérone dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'IgG anti-testostérone :** 12 bandes détachables enduites d'IgG anti-testostérone de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop :** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué à la testostérone-HRP :** 1 flacon contenant 1 ml de testostérone marqué à la peroxydase de raifort.
- **Tampon d'incubation :** 1 flacon contenant 30 ml de tampon phosphate à pH 7.5, BSA 1 g/l, stabilisateur.
- **Solution de TMB :** 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3´, 5, 5´-Tétraméthylbenzidine (H_2O_2-TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10) :** 1 flacon contenant 50 ml d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois 0.2 M. Procline <0.0015%.
- **Etalons testostérone :** 5 flacons, 1 ml chacun

Etalon 0:	0 pg/ml
Etalon 1:	10 pg/ml
Etalon 2:	50 pg/ml
Etalon 3:	200 pg/ml
Etalon 4:	1000 pg/ml

Pour les unités du SI : pg/ml x 3.47 = pmol/l

4.2. Matériels fournis

1 support de plaque
1 jeu de feuilles de recouvrement
1 mode d'emploi
1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

Lecteur de microplaque ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
Incubateur 37℃
Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
Pipettes permettant de délivrer un volume entre 10 et 1000 µL
Eau distillée
Tubes de verre
Paille en plastique
Centrifugeuse pour 3000 tours/mn
Vortex

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8°C dans l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient remis à température ambiante (22°C – 28°C) avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 ° C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'IgG anti-testostérone et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8°C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Dilution du conjugué à la testostérone-HRP

Préparer immédiatement avant utilisation. Ajouter 10 µl conjugué concentré dans 1000 µl de tampon d'incubation. Les volumes peuvent être variés en fonction de ces proportions. Mélanger doucement pendant 5 minutes avec le vortex. Le produit est stable pendant 3 heures à température ambiante (22°C - 28℃).

6.3. Etalons de testostérone

Mélanger 5 minutes avant utilisation avec un vortex. Les étalons sont prêts à l'emploi et ont les concentrations de testostérone libre suivantes :

Etalon 0:	0 pg/ml
Etalon 1:	10 pg/ml
Etalon 2:	50 pg/ml
Etalon 3:	200 pg/ml
Etalon 4:	1000 pg/ml

Après ouverture les étalons sont stables pendant 6 mois entre 2°C et 8°C.

6.4. Solution de TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé entre 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé*. *Après la première utilisation, la solution est stable jusqu'à la date d'expiration.*

6.5. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2°C et 8°C. *Après la première utilisation, la solution est stable jusqu'à la date d'expiration.*

6.6. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au $10^{ème}$. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

7.1. Méthode et Limitations

Le dosage de testostérone doit être effectué avec de la salive. Il est recommandé d'utiliser une paille en plastique pour le prélèvement de salive et de la centrifuger dans un tube en verre ou « SALIVETTE » (Sarstedt, Ref. 511534500). D'autres équipements de prélèvement d'échantillons disponibles dans le commerce n'ont pas été testés.

Prélèvement de salive aux temps indiqués.

Si aucune instruction spécifique n'a été fournie, les échantillons de salive peuvent être prélevés n'importe quand, en suivant précisément les indications suivantes :

a) Si le prélèvement de salive doit être effectué le matin, assurez vous qu'il soit fait avant le brossage des dents.
b) En journée, la salive doit être prélevée au moins 1 heure après toute nourriture ou boisson.
c) Il est très important que l'échantillon reçu soit propre – ex. aucune contamination par la nourriture, rouge à lèvre, sang (saignement de gencives) ou d'autres éléments étrangers.

7.2. Méthode

Laisser s'écouler la salive à travers la paille dans le tube de verre

1) Centrifuger l'échantillon pendant 15 minutes à 3000 tours/min
2) Conserver à –- 20°C pendant au moins 1 heure.
3) Décongeler les échantillons
4) Effectuer une 2ème centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tours/min
5) L'échantillon de salive est maintenant prêt à être testé
6) Conserver l'échantillon entre 2°C et 8°C pendant une semaine ou à - 20°C pour une conservation plus Longue.

7.3. Instructions pour le traitement de la salive avec la Salivette Sarstedt

1) Retirer le tampon de la Salivette par le côté accessible.
2) Mâcher le tampon, sans forcer, pendant 1 minute permet d'obtenir une quantité suffisante de salive.
3) Replacer le tampon dans la Salivette et bien fermer le tube avec le bouchon.
4) Centrifuger la Salivette pendant 2 minutes à 1000g (rcf) pour récupérer la salive.
5) Retirer le tube avec le tampon du réceptacle de la centrifugeuse et jeter le tampon. La salive est maintenant prête pour l'analyse (au moins 1mL de salive devrait être obtenu par cette méthode).

8. PROTOCOLE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement le mode d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter des résultats faussés. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

1 puits (ex. A1)	Pour le blanc
2 puits (ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits (ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits (ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits (ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits (ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.
Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.
Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.
Régler l'incubateur à 37°C ± 1°C.

1. Pipeter 100 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 100µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits. Trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant. (Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 6 fois.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

5. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22°C – 28°C) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
   La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesurer l'absorbance (E) des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou dans les 5 min après l'ajout de la solution stop.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA **à l'aide du blanc dans le puits A1**.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits **à 450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point du courbe étalon et de chaque échantillon.

Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons en fonction de la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).
Interpoler les valeurs des échantillons sur le courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en pg/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Comme les valeurs de la testostérone salivaire ont un cycle cicardian, nous suggérons de prélever les échantillons à la même heure (8h du matin) :
Les valeurs suivantes peuvent être utilisées comme référence jusqu'à ce que chaque laboratoire ait établi leur propre gamme.

FEMME :	normale	10 – 55 pg/ml
	Hirsutisme	25 – 85 pg/ml
	(Après traitement)	16 – 40 pg/ml
	PCO	20 – 50 pg/ml
ENFANT :		35 – 160 pg/ml
HOMME :		50 - 210 pg/ml
	Hypogonadisme	10 – 80 pg/ml

Prenez garde au fait que la détermination d'une gamme de valeurs attendues pour une population "normale" d'une méthode donnée dépend de plusieurs facteurs, comme la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le genre de population étudiée. Par conséquent chaque laboratoire doit considérer que la gamme donnée comme une indication générale par le fabriquant et produit sa propre gamme de valeurs attendues basée sur la population où est situé le laboratoire.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de testostérone pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminés dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. D'autres paramètres qui doivent être surveillés impliquent les intersections à 80, 50 et 20% de la courbe étalon pour la reproductibilité. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage
La variation intra dosage a été déterminée par un réplicat (x16) sur deux différents sérums dans un dosage. La variation intra dosage est ≤ 8.0%.

Variation Inter Dosage
La variation entre les dosages a été déterminée par un réplicat de mesures (12x) de 3 contrôles de salive différents dans différents lots. La variation entre les dosages est ≤ 13.2%.

11.2. Spécificité

La réaction croisée des anticorps calculée à 50% selon Abraham :

Testostérone	100.0 %
DHT	16.0 %
Androstenedione	0.8 %
Androstérone	0.0 %
DHEA-S	0.0 %
Cortisol	0.0 %
Cortisone	0.0 %
17 α Estradiol	0.0 %
Estrone	0.0 %
Prednison	0.0 %

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de testostérone par l'étalon 0 est 2.96 pg/ml avec un niveau de confiance 95%.

11.4. Exactitude

L'ajout de 37.5 – 100 – 500 pg/ml de testostérone aux 2 échantillons de salive a donné une valeur moyenne (±écart-type) de 98.97% ± 10.92% en référence aux concentrations originales.

11.5. Comparaison avec RIA

La méthode ELISA de la testostérone salivaire a été comparée à un autre dosage de salive disponible dans le commerce. 32 échantillons de salive ont été analysés selon les deux systèmes d'essais.
La régression linéaire a été calculée :

$y = 1{,}10\ x - 0{,}98$

$r^2 = 0{,}967$

y = Testostérone de salive de NovaTec Elisa kit
x = Testostérone de salive de DRG Elisa kit

12. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Les échantillons contaminés microbiologiquement ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Il est important pour la reproductibilité des résultats que le temps de réaction de chaque puits soit le même. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes pour éviter d'obtenir des résultats faussés. Si le pipetage prend plus de 10 minutes, suivre le même ordre de dépôt. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être ajouté dans la manipulation pour éliminer toutes erreurs pendant la réaction. Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits. Si la solution collante n'est pas retirée convenablement lors des étapes d'aspiration ou de décantation à l'eau, les résultats seront faux et la réplication faible.

13. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro par les personnes professionnelles. Pas pour l'utilisation intérieure ou externe dans les humains ou les animaux.

- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Le TMB est un réactif irritant qui peut être nocif s'il est inhale, ingéré ou absorbé par la peau. Eviter toute ingestion, inhalation, contact avec la peau ou les yeux.
- La solution stop est une solution diluée d'acide sulfurique. L'acide sulfurique est un poison, corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau et les yeux pour éviter une brûlure chimique.
- L'ajout de TMB initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être ajouté dans la manipulation pour éliminer toutes erreurs pendant la réaction.
- Eviter l'exposition du réactif TMB/ H_2O_2 à la lumière du soleil, aux métaux et oxydants. Ne pas congeler la solution.
- L'utilisation des réactifs nécessite un maximum de précaution.
- Cette méthode permet le dosage de la testostérone de 10 pg/ml à 1000 pg/ml.
- Le traitement du patient à la cortisone, aux stéroïdes naturels ou synthétiques peut nuire au dosage de la testostérone.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300® comme conservateur. Eviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Observez les directives pour exécuter le contrôle de qualité dans les laboratoires médicaux en analysant des commandes et/ou une salive mise en commun.

AVERTISSEMENT :	Aux concentrations utilisées, la Proclin 300® n'a que très peu de risque toxicologique s'il y a contact avec la peau ou les muqueuses !
AVERTISSEMENT :	L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

13.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

14. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:	DSNOV21	Testosterone Saliva (96 dosages)

BIBLIOGRAHY/ BIBLIOGRAPHIE

Joshi, U. M. et al.; Steroids 1979, 34 (1), 35
Turkes, A. et al.; J Endocrinol. 1979, 81 (2), P165
Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R.; J. Clin. Endocr. Metab. 1972, 34, 177 - 184
Widsdom G. B.; Clin. Chem. 1976, 22/8, 1243 – 1255
Rajkowski, K. M. et al. ; Steroids 1977, 29 (5), 701-713

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic *in vitro*/ Diagnostico *in vitro*/ Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote / Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	Keep away from direct sun / Vor Sonnenlicht schützen / Protéger de rayonnement solaire / Proteger de la luz solar.
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca / Microplaca
CONJ CONC	Conjugate conc./ Konjugat konz./ Conjugado conc.
INC BUF	Incubation buffer/ Inkubationspuffer/ Buffer de incubación
CAL	Calibrator resp. Standard/ Kalibrator bzw. Standard/ Callibrateur resp Etalon / Calibratore ossia Standard / Calibrador o bien Estándar
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante / Solução de paragem
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB / Solução substrato TMB
WASH BUF 10x	Washing solution 10x concentrated/ Waschlösung 10x konzentriert/ Solution de lavage concentré 10 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x10/ solución de lavado concentrado x10 / Solução de lavagem concentrada 10x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Testosterone Saliva

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.

Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	blank	Stand. 0	Stand. 1	Stand. 2	Stand. 3	Stand. 4	Sample
Standard 0	-	100 µl	-	-	-	-	-
Standard 1	-	-	100 µl	-	-	-	-
Standard 2	-	-	-	100 µl	-	-	-
Standard 3	-	-	-	-	100 µl	-	-
Standard 4	-	-	-	-	-	100 µl	-
Sample	-	-	-	-	-	-	100 µl
Diluted Conjugate	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit **Incubate for 1 h at 37 °C** Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution. In case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.							
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark							
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently. Photometric measurement at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.							

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
Email : info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

DSNOV21-engl,fr-20122013-CS